

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-266728

(43)Date of publication of application : 05.10.1999

(51)Int.CI.

A01H 4/00

(21)Application number : 10-156012

(71)Applicant : TOYOTA MOTOR CORP

(22)Date of filing : 04.06.1998

(72)Inventor : SHIMADA TAKEHIKO

(30)Priority

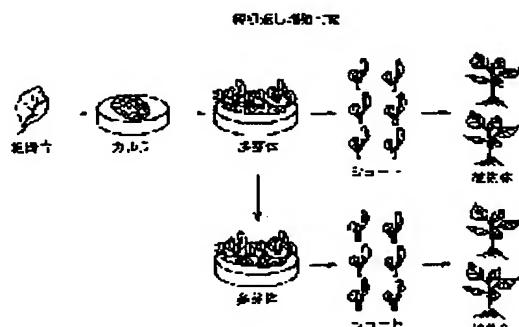
Priority number : 10 11312 Priority date : 23.01.1998 Priority country : JP

## (54) METHOD FOR LARGE AMOUNT PROLIFERATION OF PLANT OF GENUS AZALEA

## (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for proliferating a large number of a plant of the genus azalea by using a small amount of the parent plant.

**SOLUTION:** This method for a large amount proliferation of a plant of the genus azalea is to culture tissue fragments of the plant of the genus azalea in a medium containing an auxin-based plant hormone and a cytokinin-based plant hormone to form calluses, culture the calluses in a medium containing the cytokinin-based plant hormone to form multiple shoots having many shoots, cut respective shoots from the multiple shoots, if needed, culture the shoots in a medium containing the auxin-based plant hormone, and finally culture the shoots in a medium containing no plant hormones to root the shoots.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.04.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 17.05.2005

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

## [Claim(s)]

[Claim 1] A callus is made to form in the large quantity growth approach of azalea group vegetation by cultivating the explant of (1) azalea group vegetation in the culture medium containing auxin system plant hormone and cytokinin system plant hormone.;  
(2) Make the many blastemas which have much chutes form by cultivating this callus in the culture medium containing cytokinin system plant hormone.;  
(3); which each chute is cut [; ] out from these many blastemas, and makes; and (4) this chute root by cultivating by the culture medium which does not contain plant hormone — the approach characterized by things.  
[Claim 2] The approach according to claim 1 characterized by cultivating the chute cut off in this phase (3) in front of said phase (4) by the culture medium containing auxin system plant hormone behind said phase (3).  
[Claim 3] The approach according to claim 1 or 2 said explant which specialized is a petal or a folia.  
[Claim 4] An approach given in any 1 term of claims 1-3 said whose auxin system plant hormone is Indole-3-butanoic acid (IBA), indole-3-acetic acid (IAA), acetic acid (2, 4-D), 1-naphthalene acetic acids (NAA), or these combination.  
[Claim 5] An approach given in any 1 term of claims 1-5 said whose cytokinin system plant hormone is N6- (2-isopentenyladenine) (2-iP), 6-benzyl aminopurine (BAP), a 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) urea (TDZ), N-(2-chloro-4-pyridyl) N'-phenyl ureas (CPPU), or these combination.  
[Claim 6] The method according to claim 2 of cultivating the chute by the culture medium containing said auxin system plant hormone for two – four days.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

## [Claim(s)]

[Claim 1] A callus is made to form in the large quantity growth approach of azalea group vegetation by cultivating the explant of (1) azalea group vegetation in the culture medium containing auxin system plant hormone and cytokinin system plant hormone.;  
(2) Make the many blastemas which have much chutes form by cultivating this callus in the culture medium containing cytokinin system plant hormone.;  
(3); which each chute is cut [; ] out from these many blastemas, and makes; and (4) this chute root by cultivating by the culture medium which does not contain plant hormone -- the approach characterized by things.

[Claim 2] The approach according to claim 1 characterized by cultivating the chute cut off in this phase (3) in front of said phase (4) by the culture medium containing auxin system plant hormone behind said phase (3).

[Claim 3] The approach according to claim 1 or 2 said explant which specialized is a petal or a folia.

[Claim 4] An approach given in any 1 term of claims 1-3 said whose auxin system plant hormone is Indole-3-butanoic acid (IBA), indole-3-acetic acid (IAA), acetic acid (2, 4-D), 1-naphthalene acetic acids (NAA), or these combination.

[Claim 5] An approach given in any 1 term of claims 1-5 said whose cytokinin system plant hormone is N6- (2-isopentenyladenine) (2-iP), 6-benzyl aminopurine (BAP), a 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) urea (TDZ), N-(2-chloro-4-pyridyl) N'-phenyl ureas (CPPU), or these combination.

[Claim 6] The method according to claim 2 of cultivating the chute by the culture medium containing said auxin system plant hormone for two - four days.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

#### [0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the large quantity growth approach of azalea group vegetation.

#### [0002]

[Description of the Prior Art] In JP,6-189643,A, the explant of the shoot apex section of the Rhododendron vegetation The shoot which is made to elongate the shoot apex section in sterile by the culture medium which contains auxin system plant hormone and cytokinin system plant hormone as the 1st culture, and does not have a root substantially is cultivated. Subsequently as the 2nd culture It increases by transplanting this shoot to the culture medium containing auxin system plant hormone and cytokinin system plant hormone. Furthermore, a shoot without this increased root is transplanted and rooted to the culture medium containing auxin system plant hormone, and the approach of raising to a succeedingly perfect plant body is indicated.

[0003] Moreover, the shoot which JP,6-187646,A is made to elongate the shoot apex section in sterile by the culture medium which contains auxin system plant hormone and cytokinin system plant hormone for the explant of the shoot apex section of the Rhododendron vegetation, and does not have a root is cultivated. Subsequently, it increases by transplanting this shoot to the culture medium containing this both plant hormone, and the method of transplanting and rooting the leaf further excised from the base of this shoot to the fine soil for rooting, after being immersed in an auxin system plant hormone solution is indicated.

[0004] However, since each of these approaches needs to use the shoot apex section of parent vegetation, there is a trouble of needing many parent vegetation as a start ingredient in growth of many vegetation. In the conventional technique, the method of increasing azalea group vegetation to a large quantity is not learned using a small number of azalea \*\*\*\* plant body.

#### [0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Therefore, this invention tends to offer the approach of increasing azalea group vegetation to a large quantity using a small number of azalea \*\*\*\* plant body.

#### [0006]

[Means for Solving the Problem] this invention persons completed a header and this invention for the ability of a large quantity to be made to increase azalea group vegetation efficiently by using a start ingredient extractable [ many ] from one parent vegetation, such as a petal and a folia, and minding the many blastemas which have much chutes, as a result of examining many things that the above-mentioned technical problem should be solved.

[0007] Therefore, this invention makes a callus form in the large quantity growth approach of azalea group vegetation by cultivating the explant of (1) azalea group vegetation in the culture medium containing auxin system plant hormone and cytokinin system plant hormone.;

(2) Make the many blastemas which have much chutes form by cultivating this callus in the culture medium containing cytokinin system plant hormone.;

(3); which each chute is cut [ ; ] out from these many blastemas, and makes; and (4) this chute root by cultivating by the culture medium which does not contain plant hormone -- offer the

approach characterized by things. In the above-mentioned approach, it is more desirable to cultivate the chute which is behind said phase (3) and was cut off in this phase (3) in front of said phase (4) in the culture medium containing auxin system plant hormone.

[0008]

[Embodiment of the Invention] Next, the gestalt of operation of this invention is explained concretely. In drawing 1, if the petal of azalea group vegetation or its one part is cultivated as a start ingredient by the culture medium containing both auxin system plant hormone and cytokinin system plant hormone, the callus of light yellow - green will be formed in two - three months. Next, the many blastemas which have much (20-30 [ for example, ]) chutes are made to form by cultivating this callus for about four months in the culture medium containing cytokinin system plant hormone.

[0009] Next, you cut a several - 10 [ about ] chute at once, and make it root by cultivating by the culture medium which does not contain plant hormone, and this reproduces a seedling. The many blastemas after extracting a chute make a chute form by what culture is continued for as it is (for example, one month), extract several - 10 of these, are rooted by cultivating by the culture medium which does not contain plant hormone, and reproduce a seedling. Many seedlings can be reproduced by continuing cultivating many blastemas as mentioned above.

[0010] As azalea group vegetation which can apply the approach of this invention For example, HIRADOTSUTSUJI, an azalea, KIRISHIMA, MIYAMAKIRISHIMA, FUJITSUTSUJI, A climax azalea, KUROFUNETSUTSUJI, GOYOUTSUTSUJI, Rhododendron amagianum, a demon azalea, Rhododendron sanctum, the Mitsuba azalea, and KOBANO -- Japanese honewort -- an azalea and Rhododendron japonicum -- MURASAKITSUTSUJI, AKEBONOTSUTSUJI, KISHITSUTSUJI, a CHOUSENYAMA azalea, A rice cake azalea, SAKISHIMATSUTSUJI, KERAMATSUTSUJI, a TAIWAN climax azalea, a MARUBA azalea and rice -- an azalea, BAIKATSUTSUJI, HIKAGETSUTSUJI, GENKAITSUTSUJI, EZOTSUTSUJI, phone Rhododendron, HAKUSAN Rhododendron, KIBANA Rhododendron, etc. -- others -- these cultivars and species hybrids are mentioned.

[0011] As an organization which uses it as a start ingredient in the approach of this invention, although various organizations, such as a leaf, a stem, a petal, a root, a cotyledon, and a hypocotyl, can be used, the organization which can get many explants from one parent vegetation, such as a petal and a leaf, is desirable.

[0012] A callus is made to form by cultivating the above-mentioned explant as the 1st step in the culture medium containing auxin system plant hormone and cytokinin system plant hormone. As auxin system plant hormone, Indore-3-butanoic acid (IBA), a 1-naphthalene acetic acid (NAA), acetic acid (2, 4-D), indole-3-acetic acid (IAA), etc. are mentioned, it is independent, or these can be combined and used. As cytokinin system plant hormone, N6- (2-isopentenyladenine) (2-iP), 6-benzyl aminopurine (BAP), a 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) urea, an N-(2-chloro-4-pyridyl) N'-phenyl urea (CPPU), etc. are mentioned, it is independent, or these can be combined and used.

[0013] Although the combination of auxin system plant hormone and cytokinin system plant hormone can combine each hormone belonging to each above-mentioned system with arbitration For example, the combination of Indore-3-butanoic acid (IBA) and N6- (2-isopentenyladenine) (2-iP), The combination of a 1-naphthalene acetic acid (NAA) and 6-benzyl aminopurine (BAP), The combination of indole-3-acetic acid (IAA) and a 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) urea (TDZ), The combination of acetic acid (2, 4-D) and an N-chloro-4-pyridyl N'-phenyl urea (CPPU), The combination of naphthaleneacetic acid (NAA) and an N-(2-chloro-4-pyridyl) N'-phenyl urea (CPPU), The combination of acetic acid (2, 4-D) and a 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) urea (TDZ), Combination, such as combination of naphthaleneacetic acid (NAA) and a 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) urea (TDZ), is desirable, and these combination can be chosen according to the class of azalea group vegetation set as the object of growth.

[0014] Although the rate of an use rate of auxin system plant hormone and cytokinin system plant hormone and the optimum value of concentration change with classes of each plant hormone and those combination, and vegetation etc. and it can determine experimentally, the

culture-medium concentration of about 1microM-10microM and cytokinin system plant hormone of the culture-medium concentration of auxin system plant hormone is about 1microM-10microM.

[0015] Although the culture medium of the arbitration of the daily use for cultivating plant cells, such as MS culture medium, a WPM culture medium, and an Anderson culture medium, or an organization can be used as a basal medium, MS culture medium, 1 / 2MS culture medium, etc. are desirable. It is desirable to add a saccharide, for example, monosaccharide, or disaccharide to this culture medium as a carbon source, and especially cane sugar are desirable. The culture-medium concentration of sugar is for example, 10 g/L - 50 g/L, and its 30 g/L extent is desirable. 15 degrees C - 30 degrees C, preferably, in about 25 degrees C, culture is the basis of an exposure of light as stationary culture, for example, is performed under the exposure of the light of 1,000-20,000Lx. Culture for formation of a callus is usually performed for two - three months.

[0016] Next, the many blastemas which have much chutes are made to form by cultivating the callus formed as mentioned above by the culture medium containing cytokinin system plant hormone. As cytokinin system plant hormone, it is independent, or two or more sorts of aforementioned things can be used, combining them. As cytokinin system plant hormone, a 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) urea (TDZ), an N-2-chloro-4-pyridyl N'-phenyl urea (CPPU), etc. are desirable, and the concentration in a culture medium is 1-10microM preferably. A basal medium is the same as the culture medium for callus formation, and good.

[0017] Many blastemas are formed in a callus three - five months, for example, by cultivating about four months. 30 degrees C [ 15 degrees C - ] of culture are preferably performed by putting in about 25 degrees C. Light is irradiated by the reinforcement of 1,000-20,000Lx during culture. Many blastemas usually have a chute of 20-30. The 1 part (several - 10 [ for example, ]) is cut off, rooting is guided and a seedling is made to reproduce by cultivating by the culture medium which does not contain plant hormone. By continuing culture further, the many blastemas after carrying out chute extraction can form a chute further. In this way, after cultivating many blastemas for about one month, for example, a chute of several - about 10 is extracted, by repeating this, a chute can be extracted and a large number can be rooted.

[0018] Formation of the seedling by rooting can use the culture medium for plant tissue culture of the low-concentration daily use which does not contain plant hormone, for example, 1 / 2MS culture medium, 1 / 4MS culture medium, etc., and can add monosaccharide or polysaccharide, for example, cane sugar, to this. the concentration of a saccharide -- 0g/L- it is 7.5 g/L - 15 g/L preferably 50 g/L. In order to solidify a culture medium, GERANGAMU etc. can be added and this addition is usually about 0.25%. 15 degrees C - 30 degrees C, preferably, in about 25 degrees C, culture is put and is performed. An optical exposure is made into \*\* of 16 hours, and the dark (with no optical exposure) of 8 hours, and the reinforcement of an exposure has the desirable range of 1,000-20,000Lx. Usually, it roots by the culture for ten - 40 days.

[0019] After extracting a chute as mentioned above, before making it cultivate and root in the desirable mode of this invention by the culture medium which does not contain plant hormone, the rate of rooting can be made to rise to 90 - 100% by moving to the culture medium which cultivates a chute by the culture medium containing auxin system plant hormone, and does not contain plant hormone after that, and rooting it. Although the aforementioned thing can be used as auxin system plant hormone in this case, especially Indore-3-butanoic acid is desirable. The concentration of auxin system plant hormone is 1microM-10microM preferably. Although what was before enumerated as a basal medium can be used, 1 / 2MS culture medium (cane-sugar 15 g/L, GERANGAMU 0.25%) is desirable. The culture length in the culture medium containing auxin system plant hormone has two - four desirable days.

[0020] Next, it is desirable to move and acclimate the seedling which rooted to artificial soil, such as a BAKYU light. Or the chute obtained from many blastemas may be directly moved to a BAKYU light etc., and you may make it root.

[0021]

[Example] Next, an example explains this invention still more concretely.

Example 1. The plant of HIRADOTSUTSUJI which grew to 50-70cm of formation of the growth

callus of HIRADOTSUTSUJI was raised in the air-conditioned room (KOITO INDUSTRIES, KOITO TRON). The environmental condition was made into the temperature of 25 degrees C, and 70% of humidity for illuminance 6000Lx, and daylength 16 hours. The young folia from the head of a branch to 6 leaf extent was used for the experiment. After the stream washed the folia for 1 to 2 hours, immersion churning was carried out for 10 minutes with the sodium-hypochlorite solution of 0.5% of available chlorine concentration for 2 minutes by ethanol 70%. Then, after rinsing 3 times with sterilized water, it adjusted to the magnitude of 5mm extent around.

[0022] As a basal medium, what carried out 15 g/L addition of the cane sugar was used for 1 / 2MS culture medium. To this basal medium, as combination of auxin system plant hormone and cytokinin system plant hormone Indole-3-butanoic acid (IBA) and N6-(2-isopentenyladenine) (2-iP), Acetic acid (2, 4-D) and 2-isopentenyladenine (2-iP), Indole-3-acetic acid (IAA) and 2-isopentenyladenine (2-iP), The combination of acetic acid (2, 4-D) and an N-(2-chloro-4-pyridyl) N'-phenyl urea (CPPU), The combination of indole-3-acetic acid (IAA) and an N-2-chloro-4-pyridyl N'-phenyl urea (CPPU), The combination of acetic acid (2, 4-D) and a 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) urea (TDZ), Or the combination of indole-3-acetic acid (IAA) and a 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) urea (TDZ) and the combination of naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzyl aminopurine (BAP) were added, and it considered as the culture medium for callus formation. An addition is shown in a following table 1 and a following table 2. NaOH and HCl adjusted the culture medium to pH5.8, and it carried out autoclave sterilization for 20 minutes at 120 degrees C.

[0023] Culture was performed as stationary culture at the temperature of 25 degrees C for illuminance 3000Lx, and daylength 16 hours (\*\* term 16 hours, and dark term 8 hours). The result after 15 weeks of culture was shown in a table 1.

[0024]

[A table 1]

表1

植物生長調節物質の組合せによるヒラドツツジ葉片から誘導された  
カルスの状態（培養15週間後）

（植物生長調節物質の単位：μM）

		オーキシン							
		IBA	2, 4-D	IAA	NAA				
サイトカイニン		0	1	10	1	10	0	1	10
2-iP	0	B	B	B	B	B	—	B	B
	1	B	Cbr	Clg	Cbl	Cbr	B	B	—
	10	B	B	Clg	Cbr	Cbr	B	B	—
	100	B	B	B	B	B	—	—	—
BAP	0	—	—	—	—	—	—	B	B
	1	Ng	—	—	—	—	—	Ng	Cbl
	10	Nbr	—	—	—	—	—	Nbr	B
	100	Nbr	—	—	—	—	—	Nbr	B
TDZ	1	B	—	—	Cw <sup>+</sup>	Cw <sup>+</sup>	Cg	Cg	—
	10	B	—	—	Cw <sup>+</sup>	Cw <sup>+</sup>	Cbr(Cg)	Cg <sup>+</sup>	—
CPPU	0		B	B	B	B	—	—	—
	1	B	—	—	Cw <sup>+</sup>	Cw	B	B	—
	10	B	—	—	Cw <sup>+</sup>	Cw	B	B	—

\*Cg : カルス化（緑色）、Clg : カルス化（黄緑色）、

Ccy : カルス化（淡黄色）、Cbr : カルス化（茶色）、

Cbl : カルス化（枯死）、Ng : 変化無し、Nbr : 褐変、

B : 培養 5 ~ 6 週間で枯死、— : 試験せず、

+ は直径10mm程度以上のカルスが誘導、( ) はわずかにカルスが誘導

[0025] the notation in a table — Ng:change nothing, Nbr:browning, the formation of Cg:callus (green), the formation of a Clg:callus (yellowish green), and Cw: — callus-izing (white), the formation of a Ccy:callus (\*\*\*\*\*), the formation of a Cbr:callus (tea), the formation of a Cbl:callus (withering to death), and five – six weeks of B:culture show browning or withering to death. + It is shown that the callus with a diameter of 10mm or more was guided. Green or an yellow-green callus is desirable.

[0026] A passage clear from the above-mentioned table Combination with 10micro (IBA) M and 6-(2-isopentenyladenine) (2-iP) 1-10micro [ of N ] M, [ of Indore-3-butanoic acid ] Combination with 10micro (NAA) of 1-naphthalene acetic acids M, and 6-benzyl aminopurine (BAP) 10microM, And in the combination of 1micro [ of indole-3-acetic acid ] (IAA) M-10microM, and 1micro [ of 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) ureas ] (TDZ) M-10microM, the callus with suitable green – light yellow was obtained.

[0027] What carried out 30 g/L addition of the shoe cloth was made into the basal medium at formation 1 / 2MS culture medium of many blastemas, and the callus formed in this as mentioned above by the culture medium which added various plant hormone was cultivated. As plant hormone, an N-(2-chloro-4-pyridyl) N'-phenyl urea (CPPU), A 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) urea (TDZ), N6- (2-isopentenyladenine) (2-iP), 6-benzyl aminopurine (BAP), or a zeatin (N6- (trans-4-hydroxy isopentenyladenine)) was added by the concentration of 1- 10microM.

[0028] In the temperature of 25 degrees C, it cultivated for 19 weeks for illuminance 3000Lx and daylength 16 hours (\*\* term 16 hours, and dark term 8 hours). A converted number of a callus to

the cultivated callus of ratios with which many blastemas were guided were as being shown in a following table 2 and a following table 3. In addition, the callus which is producing the chute of ten or more is called many blastemas.

[0029]

[A table 2]

表2

ヒラドツツジ葉片カルスからの不定芽誘導（培養19週間後）

（植物生長調節物質の単位； $\mu$ M）

材料：IBA と 2-iP で誘導したカルス

	濃度	供試 個体数	不定芽が 誘導された 個体数	不定芽 誘導率	多芽体が 誘導された 個体数	多芽体 誘導率
CPPU	1	12	3	25%	3	25%
	5	10	7	70%	7	70%
	10	12	10	83%	7	58%
TDZ	1	12	3	33%	1	8%
	5	10	2	20%	0	0%
	10	12	1	8%	0	0%
2-iP	1	2	0	0%	0	0%
	10	2	0	0%	0	0%
BAP	1	2	0	0%	0	0%
	10	—	—	—	—	—
Zearin	1	2	0	0%	0	0%
	10	2	0	0%	0	0%

\* 1 供試個体あたりの不定芽誘導数が10本以上のものを

多芽体とした。

[0030]

[A table 3]

表3

ヒラドツツジ葉片カルスからの不定芽誘導（培養19週間後）

（植物生長調節物質の単位；  $\mu$ M）

材料：IAA と TDZ で誘導したカルス

	供試 個体数	不定芽が 誘導された 個体数	不定芽 誘導率	多芽体が 誘導された 個体数	多芽体 誘導率
CPPU	1	18	2	11%	2
	5	15	12	80%	5
	10	18	16	89%	11
TDZ	1	18	0	0 %	0 %
	5	15	0	0 %	0 %
	10	18	3	17%	0
2-iP	1	3	0	0 %	0 %
	10	3	0	0 %	0 %
BAP	1	3	0	0 %	0 %
	10	3	0	0 %	0 %
Zeaxin	1	3	0	0 %	0 %
	10	3	0	0 %	0 %

\* 1 供試個体あたりの不定芽誘導数が10本以上のものを

多芽体とした。

[0031] 1micro [ of N-(2-chloro-4-pyridyl) N'-phenyl ureas belonging to cytokinin system plant hormone ] (CPPU) M-10microM was effective as shown in a table 2 and a table 3.

[0032] The chutes extracted from the aforementioned many blastemas was \*\*\*\*ed to the culture medium which contains the cane sugar of 15 g/L, and 0.25% of GERANGAMU in rooting 1 / 2MS culture medium, and it cultivated for one month in 25 degrees C, illuminance 3000Lx, and daylength 16 hours (\*\* term 16 hours, and dark term 8 hours). The rate of rooting was about 60%.

[0033] Example 2. The plant of the azalea (Rhododenndron indicum) which grew to 50-70cm of formation of the growth callus of an azalea was raised in the air-conditioned room (KOITO INDUSTRIES, KOITO TRON). The environmental condition was made into the temperature of 25 degrees C, and 70% of humidity for illuminance 6000Lx, and daylength 16 hours. The flower bud several days before the bloom was used for the experiment. After the stream washed the flower bud for 1 to 2 hours, immersion churning was carried out for 10 minutes with the sodium-hypochlorite solution of 0.5% of available chlorine concentration. Then, after rinsing 3 times with sterilized water, the petal was adjusted to the magnitude of 5mm extent around, and it \*\*\*\*ed to the culture medium.

[0034] As a basal medium, what did 15g / L addition of shoe cloth was used for 1 / 2MS culture medium. To this basal medium, as combination of auxin system plant hormone and cytokinin system plant hormone The combination of acetic acid (2, 4-D) and an N-(2-chloro-4-pyridyl) N'-phenyl urea (CPPU), The combination of acetic acid (2, 4-D) and 2-isopentenyladenine (2-iP), The combination of acetic acid (2, 4-D) and 6-benzyl aminopurine (BAP), The combination of acetic acid (2, 4-D) and a 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) urea (TDZ), The combination of naphthaleneacetic acid (NAA) and an N-(2-chloro-4-pyridyl) N'-phenyl urea, The combination of naphthaleneacetic acid (NAA) and 2-isopentenyladenine (2-iP), The combination of naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzyl aminopurine (BAP) or the combination of naphthaleneacetic acid (NAA) and a 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) urea was added, and it considered as the culture medium for callus formation. An addition is as in the following table

4. NaOH and HCl adjusted pH to 5.8, and autoclave sterilization was carried out for 20 minutes at 120 degrees C. The result after nine weeks of culture is shown in a table 4.

[A table 4]

表4

植物生長調節物質の組合せによるサツキ花弁から誘導されたカルスの状態（培養9週間後）

（植物生長調節物質の単位； $\mu$ M）

		オーキシン				
		2, 4-D		NAA		
サイトカイニン	0	1	10	1	10	
CPPU	0	B	B	B	B	B
	1	B	CgCcy	CgCcy	CgCcy	Ccy
	10	B	CgCcy <sup>+</sup>	Cbr	CgCcy <sup>+</sup>	Ccy
2-iP	1	B	Cbr <sup>+</sup>	Cbr	Cbl	Cbl <sup>+</sup>
	10	B	Cbr <sup>+</sup>	Cbr <sup>+</sup>	Cbl	Cbr
BAP	1	B	Cbl	Cbl	Cbl	Cbl <sup>+</sup>
	10	B	Cbr	Cbr	Cbr	Cbr
TDZ	1	—	CgCcy	—	CgCcy	—
	10	—	(Cg)Ccy	—	Cg	—

\*Cg : カルス化（緑色）、Ccy : カルス化（淡黄色）、

Cbr : カルス化（茶色）、Cbl : カルス化（枯死）、

B : 培養5～6週間で枯死、— : 試験せず、

+は直径10mm程度以上のカルスが誘導、（ ）はわずかにカルスが誘導

[0035] The notation in a table shows browning or withering to death by the formation of Cg:callus (green), the formation of a Ccy:callus (light yellow), the formation of a Cbr:callus (brown), Cbl: (withering to death), and five weeks of B:culture. + A diameter shows a callus about 10mm or more. A passage clear from the above-mentioned table The combination of 1micro [ of acetic acid ] (2, 4-D) M, and 1-10micro (CPPU) of N-(2-chloro-4-pyridyl) N'-phenyl ureas M, The combination of 1micro [ of acetic acid ] (2, 4-D) M, and 1-10micro (TDZ) of 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) ureas M, The combination of 1micro [ of naphthaleneacetic acid ] (NAA) M, and 1-10micro (CPPU) of N-(2-chloro-4-pyridyl) N'-phenyl ureas M, And in the combination of 1micro [ of naphthaleneacetic acid ] (NAA) M, and 1-10micro (TDZ) of 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) ureas M, the callus with good green - light yellow was obtained.

[0036] What carried out 30 g/L addition of the shoe cloth was made into the basal medium at formation 1 / 2MS culture medium of many blastemas, and the callus formed in this as mentioned above by the culture medium which added various plant hormone was cultivated. As plant hormone, an N-(2-chloro-4-pyridyl) N'-phenyl urea (CPPU), a 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) urea (TDZ), 2-isopentenyladenine (2-iP), 6-benzyl aminopurine (BAP), or a zeatin (N6- (trans-4-hydroxy isopentenyladenine)) was added by the concentration of 1-10microM.

[0037] In the temperature of 25 degrees C, it cultivated for 19 weeks for illuminance 3000Lx and daylength 16 hours (\*\* term 16 hours, and dark term 8 hours). A number of a callus to the cultivated callus of ratios with which many blastemas were guided were as being shown in the following table 5. In addition, the callus which is producing the chute of ten or more is called many blastemas.

[0038]

[A table 5]

表5

サツキ花弁カルスからの不定芽誘導（培養18週間後）

（植物生長調節物質の単位； $\mu$ M）

材料：2,4-D とCPPUで誘導したカルス

	濃度	供試 個体数	不定芽が 誘導された 個体数	不定芽 誘導率	多芽体が 誘導された 個体数	多芽体 誘導率
CPPU	1	19	6	32%	0	0%
	5	13	8	62%	5	38%
	10	21	18	16%	14	67%
TDZ	1	21	13	62%	3	14%
	5	12	10	83%	6	50%
	10	20	18	90%	13	65%
2-iP	1	12	0	0%	0	0%
	10	11	0	0%	0	0%
BAP	1	14	0	0%	0	0%
	10	14	0	0%	0	0%
Zeaxin	1	5	0	0%	0	0%
	10	5	0	0%	0	0%

\* 1供試個体あたりの不定芽誘導数が10本以上のものを

多芽体とした。

[0039] In the callus guided in the combination of 2 and 4-D and CPPU, the N-(2-chloro-4-pyridyl) N'-phenyl urea (CPPU) or 5-10micro (TDZ) of 1-phenyl-3-(1, 2, 3-thiadiazole-5-IRU) ureas M belonging to cytokinin system plant hormone was effective as shown in a table 5.

[0040] The chutes extracted from the aforementioned many blastemas was \*\*\*\*ed to the culture medium which contains the cane sugar of 15 g/L, and 0.25% of GERANGAMU in rooting 1 / 2MS culture medium, and it cultivated for one month in 25 degrees C, illuminance 3000Lx, and daylength 16 hours (\*\* term 16 hours, and dark term 8 hours). The rate of rooting was about 26%.

[0041] Made the callus generate from the folia of HIRADOTSUTSUJI the same with having indicated in the example 3 and the growth (2) example 1 of HIRADOTSUTSUJI, many blastemas were made to form further, and the 5-10mm chutes was cut off under the stereoscopic microscope. Next, by 1 / 2MS culture medium (cane-sugar 15 g/L, GERANGAMU 0.25%) which added the Indole-3-butanoic acid of 10microM for this cut-off chutes, it transplanted to 0.8% agar medium which cultivates zero day (processing [ no ]), for one day, for two days, for four days, or for 42 days, next does not contain plant hormone and MS component, and cultivated for six weeks. The culture condition was made to be the same as that of an example 1. Consequently, the rate of rooting shown in the following table 6 was obtained. [0042]

[A table 6]

表6

処理日数 (日)	供試 個体数	発根した 個体数	発根率
無処理	19	16	84%
1	14	13	93%
2	16	16	100%
4	21	20	95%
全期間処理	26	0	0%

[0043] Compared with the case (84%) that the rate of rooting is not processed, it went up to 93% – 100% by carrying out culture (processing) for one – four days by the culture medium containing auxin system plant hormone, before cultivating the chute cut out of many blastemas and rooting it by the culture medium which does not contain plant hormone as the above-mentioned result.

[0044] Made the callus generate from the petal of an azalea the same with having indicated in the example 4 and the growth (2) example 2 of an azalea, many blastemas were made to form further, and the 5–10mm chute was cut off under the stereoscopic microscope. This cut-off chute by next, 1 / 2MS culture medium (cane-sugar 15 g/L, GERANGAMU 0.25%) which added the Indore-3-butanoic acid of 1microM or 10microM It transplanted to 1 / 4MS culture medium (cane-sugar 7.5 g/L, GERANGAMU 0.24%) which cultivates zero day (processing [ no ]), one day, two days, for four days, for eight days, for 16 days, or for 42 days, next does not contain plant hormone, and cultivated for six weeks. The culture condition was made to be the same as that of an example 1. Consequently, the rate of rooting shown in the following table 7 was obtained.

[0045]

[A table 7]

表7

処理日数 (日)	供試 個体数	IBA処理 (1 $\mu$ M)		IBA処理 (10 $\mu$ M)	
		発根した 個体数	発根率	発根した 個体数	発根率
無処理	19	5	26%		
1	10	3	30%	1	10%
2	10	5	50%	9	90%
4	10	6	60%	9	90%
8	10	2	20%	0	0%
16	9	0	0%	0	0%
42	11	0	0%	0	0%

[0046] Compared with the case (26%) that the rate of rooting is not processed, it went up to 90% by carrying out culture (processing) of the Indore-3-butanoic acid (IBA) which is auxin system plant hormone for two – four days by the culture medium of which 10microM content is done, before cultivating the chute cut out of many blastemas and rooting it by the culture medium which does not contain plant hormone as the above-mentioned result.

[0047] Although the chute cut out from many blastemas in example of comparison 1 example 4 was cultivated with indole-3-acetic acid, Indore-3-butanoic acid, and chloro indole-3-acetic acid and the 1-naphthalene acetic acid was cultivated for six weeks under the conditions of 3000Lx for light condition 16 hours by 1microM, or 1 / 2MS culture medium (cane-sugar 15 g/L, GERANGAMU 0.25%) of which 10microM content is done, rooting was not seen at all.

[0048] When the chute cut out from many blastemas in example of comparison 2 example 4 was planted in a BAMIN light, Kanumatsuchi, or a sphagnum and was cultivated for three months, it

was dramatically as low in the BAMYU light as 17% at the sphagnum 50% 33% to the rate of rooting in Kanumatsuchi.

[0049]

[Effect of the Invention] According to this invention the above passage, the vegetation of a large quantity can be proliferated very efficiently from the parent plant body of the fraction of an azalea group.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIPI are not responsible for any  
damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

---

**[Brief Description of the Drawings]**

**[Drawing 1] Drawing 1 is drawing showing the approach of this invention typically.**

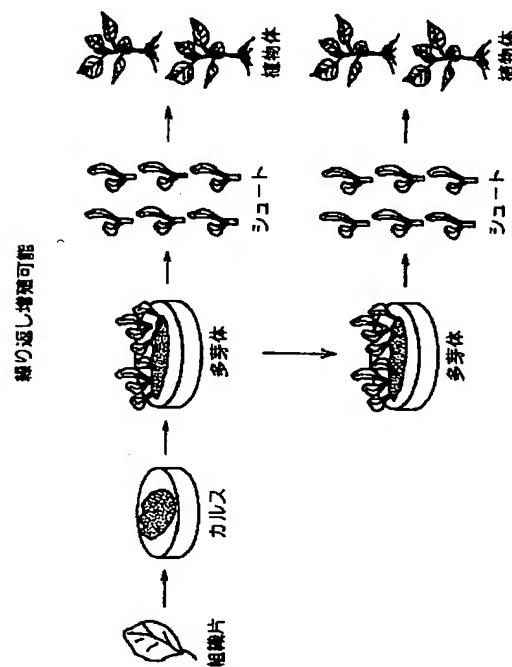
---

**[Translation done.]**

---

Drawing selection  Representative drawing 

図 1



[Translation done.]

**全項目**


---

(19)【発行国】日本国特許庁(JP)  
 (12)【公報種別】公開特許公報(A)  
 (11)【公開番号】特開平11-266728  
 (43)【公開日】平成11年(1999)10月5日  
 (54)【発明の名称】ツツジ属植物の大量増殖方法  
 (51)【国際特許分類第6版】

A01H 4/00

**【FI】**

A01H 4/00

**【審査請求】未請求**

【請求項の数】6

【出願形態】OL

【全頁数】10

(21)【出願番号】特願平10-156012  
 (22)【出願日】平成10年(1998)6月4日  
 (31)【優先権主張番号】特願平10-11312  
 (32)【優先日】平10(1998)1月23日  
 (33)【優先権主張国】日本(JP)

(71)【出願人】

【識別番号】000003207

【氏名又は名称】トヨタ自動車株式会社

【住所又は居所】愛知県豊田市トヨタ町1番地

(72)【発明者】

【氏名】島田 武彦

【住所又は居所】愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】石田 敬 (外3名)

---

**(57)【要約】**

【課題】ツツジ属植物の新規な大量増殖方法の提供。

【解決手段】ツツジ属植物の大量増殖方法において、(1)ツツジ属植物の組織片をオーキシン系植物ホルモン及びサイトカイニン系植物ホルモンを含有する培地中で培養することによりカルスの形成せしめ；(2)該カルスをサイトカイニン系植物ホルモンを含有する培地中で培養することにより、多数のシートを有する多芽体を形成せしめ；(3)該多芽体から個々のシートを切り取り、所望によりオーキシン系植物ホルモンを含有する培地中で培養した後、該シートを植物ホルモンを含有しない培地で培養することにより発根せしめる；ことを特徴とする方法。

---

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】ツツジ属植物の大量増殖方法において、(1)ツツジ属植物の組織片をオーキシン系植物ホルモン及びサイトカイニン系植物ホルモンを含有する培地中で培養することによりカルスを形成せしめ；(2)該カルスをサイトカイニン系植物ホルモンを含有する培地中で培養することにより、多数のシートを有する多芽体を形成せしめ；

(3) 該多芽体から個々のシートを切り取り; そして(4) 該シートを、植物ホルモンを含有しない培地で培養することにより発根せしめる; ことを特徴とする方法。

【請求項2】前記段階(3)の後、前記段階(4)の前に、該段階(3)において切り取ったシートを、オーキシン系植物ホルモンを含有する培地で培養することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】前記分化した組織片が花弁又は葉片である請求項1又は2に記載の方法

【請求項4】前記オーキシン系植物ホルモンが、インドール-3-酢酸(IAA)、インドール-3-酢酸(IAA)、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸(2, 4-D)もしくは1-ナフタレン酢酸(NAA)又はこれらの組合せである、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】前記サイトカイニン系植物ホルモンが、N<sup>6</sup>-(2-イソペンテニルアデニン)(2-iP)、6-ベンジルアミノプリン(BAP)、1-フェニル-3-(1, 2, 3-チアジアゾール-5-イル)尿素(TDZ)もしくはN-(2-クロロ-4-ピリジル)N'-フェニル尿素(CPPU)、又はこれらの組合せである、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】前記オーキシン系植物ホルモンを含有する培地でのシートの培養を2～4日間行う、請求項2に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

〔0001〕

【発明の属する技術分野】本発明は、ツツジ属植物の大量増殖方法に関する

[0002]

【従来の技術】特開平6-189643号公報には、シャクナゲ属植物の茎頂部の組織片を、第1回培養としてオーキシン系植物ホルモン及びサイトカイニン系植物ホルモンを含む培地で無菌的に茎頂部を伸長させて実質的に根を持たない苗条を培養し、ついで第2回目の培養として、この苗条をオーキシン系植物ホルモン及びサイトカイニン系植物ホルモンを含む培地に移植して増殖を行い、さらに、この増殖した根を持たない苗条をオーキシン系植物ホルモンを含む培地に移植して発根させ、引き続いて完全な植物体に育成する方法が記載されている。

【0003】また、特開平6-187646号公報には、シャクナゲ属植物の茎頂部の組織片をオーキシン系植物ホルモン及びサイトカイニン系植物ホルモンを含む培地で無菌的に茎頂部を伸長させて根を持たない苗条を培養し、ついでこの苗条を該両植物ホルモンを含む培地に移植して増殖を行い、さらにこの苗条の基部から切除した葉をオーキシン系植物ホルモン溶液に浸漬した後、発根用床土に移植して発根させる方法が記載されている。

【0004】しかしながら、これらの方針はいずれも、親植物の茎頂部を使用する必要があるため、多数の植物の増殖には、出発材料として多数の親植物を必要とするという問題点がある。従来技術においては、少数のツツジ属親植物体を用いて、大量にツツジ属植物を増殖する方法は知られていない。

[0005]

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は、少数のツツジ属親植物体を用いてツツジ属植物を大量に増殖する方法を提供しようとするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、花弁、葉片等、1本の親植物から多数採取することができる出発材料を使用して、多数のシートを有する多芽体を介することにより、ツツジ属植物を効率よく大量に増殖せしめることができることを見出し、本発明を完成した。

【0007】従って、本発明は、ツツジ属植物の大量増殖方法において、(1)ツツジ属植物の組織片をオーキシン系植物ホルモン及びサイトカイニン系植物ホルモンを含有する培地中で培養することによりカルスを形成せしめ、

(2) 該カルスをサイトカイニン系植物ホルモンを含有する培地中で培養することにより、多数のシユートを有する多葉体を形成せしめ、

(3) 該多芽体から個々のシートを切り取り; そして(4)該シートを、植物ホルモンを含有しない培地で培養することにより発根せしめる; ことを特徴とする方法を提供する。上記方法において、前記段階(3)の後であって前記段階(4)の前に、該段階(3)において切り取ったシートを オー

キン系植物ホルモンを含有する培地で培養するのがより好ましい。

【0008】

【発明の実施の形態】次に、本発明の実施の形態を具体的に説明する。図1において、例えば、出発材料として、ツツジ属植物の花弁又はその1部分をオーキシン系植物ホルモンとサイトカイニン系植物ホルモンとの両者を含有する培地で培養すれば2~3ヶ月で淡黄色~緑色のカルスが形成される。次にこのカルスを、サイトカイニン系植物ホルモンを含有する培地中で約4ヶ月間培養することにより多数(例えば20~30本)のシートを有する多芽体を形成せしめる。

【0009】次に、シートを1回に数本~10本程度切りとり、植物ホルモンを含有しない培地で培養することにより発根せしめ、これにより幼植物を再生する。シートを採取した後の多芽体は、そのまま培養を続ける(例えば1ヶ月)ことによりシートを形成せしめ、これを数本~10本採取して、植物ホルモンを含有しない培地で培養することにより発根させ、幼植物を再生する。上記のようにして多芽体を培養し続けることにより、多数の幼植物を再生させることができる。

【0010】本発明の方法を適用することができるツツジ属植物としては、例えばヒラドツツジ、サツジ、キリシマ、ミヤマキリシマ、フジツツジ、ヤマツツジ、クロフネツツジ、ゴヨウツツジ、アマギツツジ、オニツツジ、ジングウツツジ、ミツバツツジ、コバノミツバツツジ、レンゲツツジ、ムラサキツツジ、アケボノツツジ、キシツツジ、チョウセンヤマツツジ、モチツツジ、サキシマツツジ、ケラマツツジ、タイワンヤマツツジ、マルバサツキ、コメツツジ、バイカツツジ、ヒカゲツツジ、ゲンカイツツジ、エゾツツジ、ホンシャクナゲ、ハクサンシャクナゲ、キバナシャクナゲ、などの他、これらの栽培品種および種間雑種が挙げられる。

【0011】本発明の方法において出発材料として使用する組織としては、葉、茎、花弁、根、子葉、胚軸、等種々の組織を使用することができるが、花弁、葉等、1本の親植物から多数の組織片を得ることができる組織が好ましい。

【0012】第1段階としては、上記の組織片を、オーキシン系植物ホルモン及びサイトカイニン系植物ホルモンを含有する培地で培養することによりカルスを形成せしめる。オーキシン系植物ホルモンとしては、インドール-3-酪酸(IAA)、1-ナフタレン酢酸(NAA)、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸(2, 4-D)、インドール-3-酢酸(IAA)等が挙げられ、これらを単独で又は組合合わせて使用することができる。サイトカイニン系植物ホルモンとしてはN<sup>6</sup>-(2-イソペンテニルアデニン)(2-iP)、6-ベンジルアミノプリン(BAP)、1-フェニル-3-(1, 2, 3-チアジアゾール-5-イル)尿素、N-(2-クロロ-4-ピリジル)N' -フェニル尿素(CPPU)等が挙げられ、これらを単独で、又は組合合わせて使用することができる。

【0013】オーキシン系植物ホルモンとサイトカイニン系植物ホルモンとの組合せは、上記の各系統に属する個々のホルモンを任意に組合せることができるが、例えばインドール-3-酪酸(IAA)とN<sup>6</sup>-(2-イソペンテニルアデニン)(2-iP)との組合せ、1-ナフタレン酢酸(NAA)と6-ベンジルアミノプリン(BAP)との組合せ、インドール-3-酢酸(IAA)と1-フェニル-3-(1, 2, 3-チアジアゾール-5-イル)尿素(TDZ)との組合せ、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸(2, 4-D)とN-(2-クロロ-4-ピリジル)N' -フェニル尿素(CPPU)との組合せ、ナフタレン酢酸(NAA)とN-シ酢酸(2, 4-D)と1-フェニル-3-(1, 2, 3-チアジアゾール-5-イル)尿素(TDZ)との組合せ、ナフタレン酢酸(NAA)と1-フェニル-3-(1, 2, 3-チアジアゾール-5-イル)尿素(TDZ)との組合せ等の組合せが好ましく、これらの組合せは、増殖の対象となるツツジ属植物の種類により選択することができる。

【0014】オーキシン系植物ホルモンとサイトカイニン系植物ホルモンとの使用比率及び濃度の最適値は、個々の植物ホルモン及びそれらの組合せ、植物の種類等により異なり、実験的に決定することができるが、オーキシン系植物ホルモンの培地濃度はおよそ1,,M~10,,M、サイトカイニン系植物ホルモンの培地濃度はおよそ1,,M~10,,Mである。

【0015】基礎培地としては、MS培地、WPM培地、Anderson培地等植物細胞又は組織を培養するための常用の任意の培地を用いることができるが、MS培地、1/2MS培地等が好ましい。この培地には炭素源として糖類、例えば単糖類又は二糖類を加えることが望ましく、ショ糖が特に好ましい。糖の培地濃度は、例えば10g/L~50g/Lであり、30g/L程度が好ましい。培養は15°C~30°C、好ましくは約25°Cにおいて、静置培養として、光の照射のもとで、例えば1, 000~20, 000Lxの光の照射のもとで行われる。カルスの形成のための培養は通常、2~3ヶ月間行われる。

【0016】次に、上記のようにして形成したカルスを、サイトカイニン系植物ホルモンを含有する培

地で培養することにより、多数のシートを有する多芽体を形成せしめる。サイトカイニン系植物ホルモンとしては前記のものを単独で又は複数種組合せて使用することができる。サイトカイニン系植物ホルモンとしては、1-フェニル-3-(1, 2, 3-チアジアゾール-5-イル)尿素(TDZ)、N-2-クロロ-4-ピリジル)N'-フェニル尿素(CPPU)等が好ましく、培地中の濃度は好ましくは1~10, Mである。基本培地は、カルス形成用培地と同じでよい。

【0017】カルスを3~5ヶ月、例えば4ヶ月程度培養することにより多芽体が形成される。培養は15°C~30°C、好ましくは約25°Cにおいて、静置して行われる。培養中、光を、例えば1, 000~20, 000Lxの強度で照射する。多芽体は通常20~30本のシートを有する。その1部分、例えば数本~10本を切り取り、植物ホルモンを含有しない培地で培養することにより発根を誘導して幼植物を再生せしめる。シート採取した後の多芽体はさらに培養を続けることにより、さらにシートを形成することができる。こうして、例えば多芽体を約1ヶ月培養した後数本~約10本のシートを採取し、これを反復することにより多数をシートを採取して発根させることができる。

【0018】発根による幼植物の形成は、植物ホルモンを含有しない低濃度の常用の植物組織培養用培地、例えば1/2MS培地、1/4MS培地等を使用することができ、これには、单糖類又は多糖類、例えばショ糖を添加することができる。糖類の濃度は0g/L~50g/L、好ましくは7. 5g/L~15g/Lである。培地を固化するため、例えばゲランガム等を添加することができ、この添加量は通常約0. 25%である。培養は、15°C~30°C、好ましくは約25°Cにおいて、静置して行う。光照射は、例えば、16時間の明及び8時間の暗(光照射なし)とし、照射の強度は1, 000~20, 000Lxの範囲が好ましい。通常、10~40日間の培養で発根する。

【0019】本発明の好ましい態様においては、上記のようにしてシートを採取した後、植物ホルモンを含有しない培地で培養して発根せしめる前に、オーキシン系植物ホルモンを含有する培地でシートを培養し、その後で植物ホルモンを含有しない培地に移して発根させることにより、発根率を90~100%に上昇せしめることができる。この場合のオーキシン系植物ホルモンとしては前記のものを使用することができるがインドール-3-酢酸が特に好ましい。オーキシン系植物ホルモンの濃度は好ましくは1, M~10, Mである。基本培地としては前に列挙したものを使用することができるが、1/2MS培地(ショ糖15g/L、ゲランガム0. 25%)が好ましい。オーキシン系植物ホルモンを含有する培地での培養期限は2~4日間が好ましい。

【0020】次に、発根した幼植物を、バーキュライト等の人工土壌に移して馴化するのが好ましい。あるいは、多芽体から得られたシートを、直接、バーキュライト等に移して発根させてもよい。

【0021】

【実施例】次に、本発明を、実施例によりさらに具体的に説明する。

実施例1. ヒラドツツジの増殖カルスの形成50~70cmに生長したヒラドツツジの苗木を人工気象室(小糸工業、コイトロン)内で育成した。環境条件は照度6000Lx、日長16時間、温度25°C、湿度70%とした。実験には枝の先端から6葉程度までの若い葉片を用いた。葉片を流水で1~2時間洗浄した後、70%エタノールで2分間、有効塩素濃度0. 5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で10分間浸漬攪拌した。続いて滅菌水で3回すすいだ後、5mm四方程度の大きさに調整した。

【0022】基本培地として、1/2MS培地にショ糖を15g/L添加したものを用いた。この基本培地に、オーキシン系植物ホルモンとサイトカイニン系植物ホルモンとの組合せとして、インドール-3-酢酸(IBA)とN<sup>6</sup>-(2-イソペンテニルアデニン)(2-iP)、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸(2, 4-D)と2-イソペンテニルアデニン(2-iP)、インドール-3-酢酸(IAA)と2-イソペンテニルアデニン(2-iP)、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸(2, 4-D)とN-(2-クロロ-4-ピリジル)N'-フェニル尿素(CPPU)との組合せ、インドール-3-酢酸(IAA)とN-2-クロロ-4-ピリジル)N'-フェニル尿素(CPPU)との組合せ、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸(2, 4-D)と1-フェニル-3-(1, 2, 3-チアジアゾール-5-イル)尿素(TDZ)との組合せ、又はインドール-3-酢酸(IAA)と1-フェニル-3-(1, 2, 3-チアジアゾール-5-イル)尿素(TDZ)との組合せ、ナフタレン酢酸(NAA)と6-ベンジルアミノプリン(BAP)の組み合せを添加してカルス形成用培地とした。添加量は下記の表1及び表2に示す。培地はNaOH及びHClによりpH5. 8に調整し、120°Cにて20分間オートクレーブ滅菌した。

【0023】培養は、照度3000Lx、日長16時間(明期16時間、暗期8時間)、温度25°Cにて、静置培養として行った。培養15週間後の結果を表1に示した。

【0024】

【表1】

表1

植物生長調節物質の組合せによるヒラドツツジ葉片から誘導されたカルスの状態（培養15週間後）

（植物生長調節物質の単位： $\mu M$ ）

サイトカイニン	IBA			オーキシン		IAA		NAA		
	0	1	10	1	10	1	10	0	1	10
2-iP	0	B	B	B	B	B	B	—	B	B
	1	B	Cbr	Clg	Cbl	Cbr	B	B	—	—
	10	B	B	Clg	Cbr	Cbr	B	B	—	—
	100	B	B	B	B	B	B	—	—	—
BAP	0	—	—	—	—	—	—	—	B	B
	1	Ng	—	—	—	—	—	—	Ng	Cbl
	10	Nbr	—	—	—	—	—	Nbr	B	Ccy
	100	Nbr	—	—	—	—	—	Nbr	B	B
TDZ	1	B	—	—	Cw <sup>+</sup>	Cw <sup>+</sup>	Cg	Cg	—	—
	10	B	—	—	Cw <sup>+</sup>	Cw <sup>+</sup>	Cbr(Cg)	Cg <sup>+</sup>	—	—
CPPU	0	—	—	—	B	B	B	B	—	—
	1	B	—	—	Cw <sup>+</sup>	Cw	B	B	—	—
	10	B	—	—	Cw <sup>+</sup>	Cw	B	B	—	—

\*Cg : カルス化（緑色）、Clg : カルス化（黄緑色）、

Ccy : カルス化（淡黄色）、Cbr : カルス化（茶色）、

Cbl : カルス化（枯死）、Ng : 変化なし、Nbr : 褐変、

B : 培養5～6週間で枯死、— : 試験せず、

+は直径10mm程度以上のカルスが誘導、（ ）はわずかにカルスが誘導

【0025】表中の記号は、Ng:変化なし、Nbr:褐変、Cg:カルス化（緑）、Clg:カルス化（黄緑）、Cw:カルス化（白色）、Ccy:カルス化（淡黄色）、Cbr:カルス化（茶）、Cbl:カルス化（枯死）、B:培養5～6週間で褐変又は枯死を示す。+は直径10mm以上のカルスが誘導されたことを示す。緑色又は黄緑色のカルスが好ましい。

【0026】上記の表から明らかな通り、インドール-3-酪酸(IBA)10, $\mu M$ とN<sup>6</sup>-(2-イソペンテニルアデニン)(2-iP)1～10, $\mu M$ との組合せ、1-ナフタレン酢酸(NAA)10, $\mu M$ と6-ベンジルアミノプリン(BAP)10, $\mu M$ との組合せ、及びインドール-3-酢酸(IAA)1, $\mu M$ ～10, $\mu M$ と1-フェニル-3-(1, 2, 3-チアジアゾール-5-イル)尿素(TDZ)1, $\mu M$ ～10, $\mu M$ との組合せにおいて、緑色～淡黄色の好適なカルスが得られた。

【0027】多芽体の形成1/2MS培地にシュークロースを30g/L添加したものを基礎培地とし、これに種々の植物ホルモンを添加した培地で上記のようにして形成したカルスを、培養した。植物ホルモンとしては、N-(2-クロロ-4-ピリジル)N'-フェニル尿素(CPPU)、1-フェニル-3-(1, 2, 3-チアジアゾール-5-イル)尿素(TDZ)、N<sup>6</sup>-(2-イソペンテニルアデニン)(2-iP)、6-ベンジルアミノプリン(BAP)又はゼアチン(N<sup>6</sup>-(trans-4-ヒドロキシイソペンテニルアデニン))を1～10, $\mu M$ の濃度で添加した。

【0028】照度3000Lx、日長16時間(明期16時間、暗期8時間)温度25°Cにおいて19週間培養した。培養したカルスに対する、多芽体が誘導された転換したカルスの数の比率は次の表2及び表3に示す通りであった。なお、10本以上のシートを生じさせているカルスを多芽体と称する。

【0029】

【表2】

表2  
ヒラドツツジ葉片カルスからの不定芽誘導（培養10週間後）  
(植物生長調節物質の単位:  $\mu$ M)

材料: IBA と 2-iP で誘導したカルス						
	濃度	供試 個体数	不定芽が 誘導された 個体数	不定芽 誘導率	多芽体が 誘導された 個体数	誘導率
CPPU	1	12	3	25%	3	25%
	5	10	7	70%	7	70%
	10	12	10	83%	7	58%
TDZ	1	12	3	33%	1	8%
	5	10	2	20%	0	0%
	10	12	1	8%	0	0%
2-iP	1	2	0	0%	0	0%
	10	2	0	0%	0	0%
BAP	1	2	0	0%	0	0%
	10	—	—	—	—	—
Zeatin	1	2	0	0%	0	0%
	10	2	0	0%	0	0%

\* 1供試個体あたりの不定芽誘導数が10本以上のものを

多芽体とした。

【0030】

【表3】

表3

ヒラドツツジ葉片カルスからの不定芽誘導（培養10週間後）

（植物生長調節物質の単位： $\mu\text{M}$ ）

材料：IAA と TDZ で誘導したカルス

	供試 個体数	不定芽が 誘導された 個体数	不定芽 誘導率	多芽体が 誘導された 個体数	多芽体 誘導率
CPPU	1	18	2	11%	2
	5	15	12	80%	5
	10	18	16	89%	11
TDZ	1	18	0	0 %	0 %
	5	15	0	0 %	0 %
	10	18	3	17%	0
2-iP	1	3	0	0 %	0 %
	10	3	0	0 %	0 %
BAP	1	3	0	0 %	0 %
	10	3	0	0 %	0 %
Zeatin	1	3	0	0 %	0 %
	10	3	0	0 %	0 %

\* 1 供試個体あたりの不定芽誘導数が10本以上のものを

多芽体とした。

【0031】表2及び表3に示す通り、サイトカイニン系植物ホルモンに属するN-(2-クロロ-4-ピリジル)N'-(フェニル)尿素(CPPU)1,,M~10,,Mが有効であった。

【0032】発根1/2MS培地に、15g/Lのショ糖及び0.25%のゲランガムを含む培地に前記の多芽体から採取したシートを置床し、25°C、照度3000Lx、日長16時間(明期16時間、暗期8時間)にて1ヶ月間培養した。発根率は約60%であった。

【0033】実施例2. サツキの増殖カルスの形成50~70cmに生長したサツキ(*Rhododendron indicum*)の苗木を、人工気象室(小糸工業、コイトロン)内で育成した。環境条件は照度6000Lx、日長16時間、温度25°C、湿度70%とした。実験には開花数日前の花蕾を用いた。花蕾を流水で1~2時間洗浄した後、有効塩素濃度0.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で10分間浸漬攪拌した。続いて滅菌水で3回すすいだ後、花弁を5mm四方程度の大きさに調整し、培地に置床した。

【0034】基本培地として、1/2MS培地にシュークロースを15g/L添加したものを用いた。この基本培地に、オーキシン系植物ホルモンとサイトカイニン系植物ホルモンとの組合せとして、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸(2, 4-D)とN-(2-クロロ-4-ピリジル)N'-(フェニル)尿素(CPPU)との組合せ、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸(2, 4-D)と2-イソペンテニルアデニン(2-iP)との組合せ、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸(2, 4-D)と6-ベンジルアミノプリン(BAP)との組合せ、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸(2, 4-D)と1-フェニル-3-(1, 2, 3-チアジアゾール-5-イル)尿素(TDZ)との組合せ、ナフタレン酢酸(NAA)とN-(2-クロロ-4-ピリジル)N'-(フェニル)尿素との組合せ、ナフタレン酢酸(NAA)と2-イソペンテニルアデニン(2-iP)との組合せ、ナフタレン酢酸(NAA)と6-ベンジルアミノプリン(BAP)との組合せ、又はナフタレン酢酸(NAA)と1-フェニル-3-(1, 2, 3-チアジアゾール-5-イル)尿素との組合せ、を添加してカルス形成用培地とした。添加量は下記表4の通りである。NaOH及びHClによりpHを5.8に調整し、120°Cにて20分間オートクレーブ滅菌した。培養9週間後の結果を表4に示す。

【表4】

表4

植物生長調節物質の組合せによるサツキ花弁から誘導されたカルスの状態（培養9週間後）

（植物生長調節物質の単位：μM）

サイトカイニン	オーキシン					
	2,4-D			NAA		
	0	1	10	1	10	
CPPU	0	B	B	B	B	B
	1	B	CgCcy	CgCcy	CgCcy	Ccy
	10	B	CgCcy <sup>+</sup>	Cbr	CgCcy <sup>+</sup>	Ccy
2-iP	1	B	Cbr <sup>+</sup>	Cbr	Cbl	Cbl <sup>+</sup>
	10	B	Cbr <sup>+</sup>	Cbr <sup>+</sup>	Cbl	Cbr
BAP	1	B	Cbl	Cbl	Cbl	Cbl <sup>+</sup>
	10	B	Cbr	Cbr	Cbr	Cbr
TDZ	1	—	CgCcy	—	CgCcy	—
	10	—	(Cg)Ccy	—	Cg	—

\*Cg:カルス化（緑色）、Ccy:カルス化（淡黄色）、

Cbr:カルス化（茶色）、Cbl:カルス化（枯死）、

B:培養5～6週間で枯死、—:試験せず、

+:は直径10mm程度以上のカルスが誘導、（ ）はわずかにカルスが誘導

【0035】表中の記号は、Cg:カルス化（緑色）、Ccy:カルス化（淡黄色）、Cbr:カルス化（茶色）、Cbl:（枯死）、B:培養5週間で褐変又は枯死、を示す。+:は、直径が10mm程度以上のカルスを示す。上記の表から明らかな通り、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)1,,MとN-(2-クロロ-4-ピリジル)N'-(フェニル尿素(CPPU)1～10,,Mとの組合せ、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)1,,Mと1-フェニル-3-(1,2,3-チアジアゾール-5-イル)尿素(TDZ)1～10,,Mとの組合せ、ナフタレン酢酸(NAA)1,,MとN-(2-クロロ-4-ピリジル)N'-(フェニル尿素(CPPU)1～10,,Mとの組合せ、及びナフタレン酢酸(NAA)1,,Mと1-フェニル-3-(1,2,3-チアジアゾール-5-イル)尿素(TDZ)1～10,,Mとの組合せにおいて、緑色～淡黄色の良好なカルスが得られた。

【0036】多芽体の形成1/2MS培地にシュークロースを30g/L添加したものを基本培地とし、これに種々の植物ホルモンを添加した培地で上記のようにして形成したカルスを、培養した。植物ホルモンとしては、N-(2-クロロ-4-ピリジル)N'-(フェニル尿素(CPPU)、1-フェニル-3-(1,2,3-チアジアゾール-5-イル)尿素(TDZ)、2-イソペンテニルアデニン(2-iP)、6-ベンジルアミノプリン(BAP)又はゼアチン(N<sup>6</sup>-(trans-4-ヒドロキシイソペンテニルアデニン))を1～10,,Mの濃度で添加した。

【0037】照度3000Lx、日長16時間(明期16時間、暗期8時間)温度25°Cにおいて19週間培養した。培養したカルスに対する、多芽体が誘導されたカルスの数の比率は次の表5に示す通りであった。なお、10本以上のシートを生じさせているカルスを多芽体と称する。

【0038】

【表5】

表5

サツキ花弁カルスからの不定芽誘導（培養18週間後）

（植物生長調節物質の単位： $\mu$ M）

材料：2,4-DとCPPUで誘導したカルス

	濃度	供試 個体数	不定芽が 誘導された 個体数	不定芽 誘導率	多芽体が 誘導された 個体数	多芽体 誘導率
CPPU	1	19	6	32%	0	0%
	5	13	8	62%	5	38%
	10	21	16	16%	14	67%
TDZ	1	21	13	62%	3	14%
	5	12	10	83%	6	50%
	10	20	18	90%	13	65%
2-iP	1	12	0	0%	0	0%
	10	11	0	0%	0	0%
BAP	1	14	0	0%	0	0%
	10	14	0	0%	0	0%
Zeatin	1	5	0	0%	0	0%
	10	5	0	0%	0	0%

\* 1供試個体あたりの不定芽誘導数が10本以上のものを

多芽体とした。

【0039】表5に示す通り、2,4-DとCPPUの組み合わせで誘導したカルスにおいて、サイトカイン系植物ホルモンに属するN-(2-クロロ-4-ピリジル)N'-フェニル尿素(CPPU)又は1-フェニル-3-(1,2,3-チアジアゾール-5-イル)尿素(TDZ)5~10, $\mu$ Mが有効であった。

【0040】発根1/2MS培地に、15g/Lのショ糖及び0.25%のゲランガムを含む培地に前記の多芽体から採取したシートを置床し、25°C、照度3000Lx、日長16時間(明期16時間、暗期8時間)にて1ヶ月間培養した。発根率は約26%であった。

【0041】実施例3、ヒラドツツジの増殖(2)実施例1に記載したのと同様にしてヒラドツツジの葉片からカルスを生成せしめ、さらに多芽体を形成せしめ、実体顕微鏡下で5~10mmのシートを切り取った。次に、この切り取ったシートを、10, $\mu$ Mのインドール-3-酪酸を添加した1/2MS培地(ショ糖15g/L、ゲランガム0.25%)で、0日間(無処理)、1日間、2日間、4日間又は42日間培養し、次に、植物ホルモン及びMS成分を含有しない0.8%寒天培地に移植して6週間培養した。培養条件は実施例1と同様にした。その結果、次の表6に示す発根率が得られた。

【0042】

【表6】

表6

処理日数 (日)	供試 個体数	発根した 個体数	発根率
無処理	19	16	84%
1	14	13	93%
2	16	16	100%
4	21	20	95%
全期間処理	26	0	0%

【0043】上記の結果の通り、多芽体から切り取ったシートを、植物ホルモンを含有しない培地で

培養して発根させるのに先立って、オーキシン系植物ホルモンを含有する培地で1～4日間培養(処理)することにより、発根率が、無処理の場合(84%)に比べて93%～100%に上昇した。

【0044】実施例4、サツキの増殖(2)実施例2に記載したのと同様にしてサツキの花弁からカルスを生成せしめ、さらに多芽体を形成せしめ、実体顕微鏡下で5～10mmのシートを切り取った。次に、この切り取ったシートを、1,,M又は10,,Mのインドール-3-酢酸を添加した1/2MS培地(ショ糖15g/L、ゲランガム0.25%)で、0日間(無処理)、1日間、2日間、4日間、8日間、16日間又は42日間培養し、次に、植物ホルモンを含有しない1/4MS培地(ショ糖7.5g/L、ゲランガム0.24%)に移植して6週間培養した。培養条件は実施例1と同様にした。その結果、次の表7に示す発根率が得られた。

【0045】

【表7】

表7

処理日数 (日)	供試 個体数	IBA処理 (1 $\mu$ M)		IBA処理 (10 $\mu$ M)	
		発根した 個体数	発根率	発根した 個体数	発根率
無処理	19	5	26%		
1	10	3	30%	1	10%
2	10	5	50%	9	90%
4	10	6	60%	9	90%
8	10	2	20%	0	0%
16	9	0	0%	0	0%
42	11	0	0%	0	0%

【0046】上記の結果の通り、多芽体から切り取ったシートを、植物ホルモンを含有しない培地で培養して発根させるのに先立って、オーキシン系植物ホルモンであるインドール-3-酢酸(IBA)を10,,M含有する培地で2～4日間培養(処理)することにより、発根率が、無処理の場合(26%)に比べて90%に上昇した。

【0047】比較例1実施例4において多芽体から切り取ったシートを、インドール-3-酢酸、インドール-3-酢酸、クロロインドール-3-酢酸、又は1-ナフタレン酢酸を1,,M又は10,,M含有する1/2MS培地(ショ糖15g/L、ゲランガム0.25%)で、明条件16時間、3000Lxの条件下で6週間培養したが、発根は全く見られなかった。

【0048】比較例2実施例4において多芽体から切り取ったシートを、バーミンライト、鹿沼土又は水苔に植え付けて3ヶ月間培養したところ、発根率にバーミュライトで33%、鹿沼土で50%、水苔で17%と非常に低かった。

【0049】

【発明の効果】以上の通り、本発明によれば、ツツジ属の少数の親植物体から、非常に効率的に、大量の植物を増殖させることができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の方法を模式的に示す図である。

【図1】

